



اثرات تخریبی سم دیازینون بر بافت آبشش بچه‌ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*)

سید علی‌اکبر هدایتی^{۱*}، فاطمه خانی^۱، مریم شریفیان^۱، محسن خلیلی^۲

^۱دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد

نوع مقاله:

چکیده

کوتاه

تعداد ۱۰۵ قطعه بچه ماهی کلمه با میانگین وزنی ۲/۵ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهی کلمه بندر ترکمن تهیه و به مدت یک هفته در معرض ۵ غلظت از سم دیازینون به صورت ۰، ۰/۲۵٪، ۰/۵۰٪، ۰/۷۵٪ و ۱/۰۰٪ از سمیت کشنده (۰، ۰/۴۲، ۰/۸۵، ۱/۲۸ و ۱/۷۱ میلی گرم بر لیتر) قرار گرفتند. نتایج حاکی از این بود که با پیشرفت غلظت سم آسیب‌های وارده به بافت آبشش از قبیل پرخونی و خونریزی، شکستگی و اتصال لاملاهای ثانویه، ریختگی یکطرفه و دوطرفه لاملاهای آبششی و کوتاه شدن لاملاهای ثانویه، گزری شدن تیغه‌های آبششی، متورم و پرسلولی شدن لاملاها شدیدتر شد.

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۰۳/۱۲

اصلاح: ۹۴/۱۱/۲۶

پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۴

کلمات کلیدی:

آفت کش

دیازینون

ماهی کلمه

مقدمه

تجمع مواد آلاینده در پیکره دریای خزر به علت بسته بودن آن به نوعی باعث بحران زیست محیطی در این دریا شده است. شمال ایران یکی از قطب‌های مهم کشاورزی کشور می‌باشد که در جنوب دریای خزر قرار گرفته است و با توجه به وجود زمینهای زیاد کشاورزی و توسعه صنعت کشاورزی استفاده از سموم آفت کش در این مزارع بسیار افزایش پیدا کرده است. سموم کشاورزی از طریق پسابهای صنعتی، شستشوی مستقیم، ریزش باران بر روی مناطق سمپاشی شده، زهکشی کشاورزی و آبیاری از محل‌های مصرف شده این سموم وارد منابع آبی می‌گردد. استفاده بیش از حد این سموم باعث به خطر افتادن سلامت جوامع بشری و موجودات غیرهدفی که در معرض این سموم قرار دارند، می‌شود (Shamloofar and Hajimoradloo, 2008). سموم آفت کش بر اساس نوع ساختار شیمیایی به سموم ارگانوفسفره، ارگانوکلره، ارگانوازت (کاربامات) و پیرتروئیدها دسته بندی می‌شوند (Pourahmad, 2006).

دیازینون جزء سموم ارگانوفسفره بوده که مکانیسم عمل آن مانند سایر مواد ارگانوفسفره می‌باشد؛ به این صورت که باعث مهار کلی آنزیم‌ها و به طور عمده آنزیم استیل کولین می‌گردد. این سموم از راه آبششها، آب، غذا و پوست می‌توانند وارد بدن ماهی شوند (Khoshbavar Rostami et al., 2005). از عواملی که باعث مسمومیت انتخابی دیازینون برای انواع مختلف ماهی‌ها می‌شود می‌توان به مهار فعالیت استیل کولین استراز، میزان توانایی یا قابلیت ماهی در دفع سم و متفاوت بودن راه و محل

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Hedayati@gau.ac.ir

جذب سم دیازینون اشاره کرد (Oh *et al.*, 1991؛ Khoshbavar Rostami *et al.*, 2005). همزمانی استفاده از دیازینون در مزارع کشاورزی و راهیابی آنها به منابع آبی و مهاجرت ماهیان به رودخانه‌ها برای تولیدمثل و تخم‌ریزی و گذراندن دوران لاروی در این مناطق و همچنین رهاسازی بچه‌ماهیان خاویاری و استخوانی برای بازسازی ذخایر در این رودخانه‌ها که در معرض آلاینده‌های صنعتی و کشاورزی هستند تاثیراتی بر روی پارامترهای هماتولوژی و هیستولوژی این ماهیان می‌گذارد. شدت تاثیر دیازینون در گونه‌های مختلف ماهی متفاوت بوده که به طور عمده تابع سن، جنسیت، اندازه بدن ماهی، شرایط اقلیمی، شیمی محیط زیست و سایر فاکتورها می‌باشد (Khoshbavar Rostami *et al.*, 2005). ماهی کلمه یکی از ماهیان مهم اقتصادی دریای خزر می‌باشد و همچنین نقش مهمی در زنجیره غذایی فیل ماهی دارا می‌باشد. این گونه مانند برخی دیگر از ماهیان دریای خزر جهت تولیدمثل به رودخانه‌ها مهاجرت می‌کند. اما در سالهای اخیر به علت صید بی‌رویه، تخریب رودخانه‌ها، ایجاد سد و ورود انواع فاضلابهای صنعتی و شهری جمعیت آنها به شدت کاهش یافته است. در این تحقیق سعی شده است که تاثیر سم دیازینون که یکی از پرمصرف‌ترین سموم مورد استفاده در مزارع کشاورزی است بر بافت آبشش ماهی کلمه که یکی از ماهیان اقتصادی کشورمان ایران می‌باشد، مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در تابستان ۱۳۹۱ در کارگاه تکثیر ماهیان زینتی واقع در استان گلستان، شهر گرگان انجام گرفت. جهت انجام این تحقیق تعداد ۱۰۵ عدد بچه ماهی کلمه با میانگین وزنی ۱/۵ تا ۲/۵ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهی کلمه بندر ترکمن واقع در استان گلستان تهیه و برای انجام آزمایش به کارگاه تکثیر ماهیان زینتی وارد شد. بچه ماهی‌ها به مدت دو هفته برای سازگار شدن با شرایط محیط، درون مخازن فایبرگلاس قرار گرفته و با غذای انرژی ۳۰۰۱ شرکت چینه دانه در حد سیری تغذیه شدند.

برای انتقال ماهیان به آکواریوم‌ها، ابتدا مقدار ۲۰ لیتر از آب شهری کلرزدایی شده، درون هر آکواریوم ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت عمل هوادهی انجام گرفت. ۲۴ ساعت قبل از انتقال ماهی‌ها به درون آکواریوم‌ها غذادهی قطع گردید. بر اساس آزمایش اولیه و نتایج آزمون سمیت کشنده این گونه با LC_{50} که برابر ۱/۷۱ ppm به دست آمده بود (Hedayati *et al.*, 2015)، آزمایش تحت کشنده به مدت یک هفته در ۴ تیمار و با ۳ تکرار (۰/۴۲ppm، ۰/۸۵ppm، ۱/۲۸ppm و ۱/۷۱ppm) دیازینون به همراه یک گروه شاهد که به صورت ۰ (شاهد)، ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰ درصد LC_{50} دیازینون در پیش آزمایش انتخاب شده بود انجام گرفت. لازم به ذکر است در تیمار شاهد تمامی شرایط سایر تیمارها ثابت در نظر گرفته شده و تنها عامل آلودگی وجود نداشت.

در طی دوره آزمایش، میانگین میزان دما 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد، میانگین مقدار $pH=7/5-8$ و میانگین مقدار اکسیژن محلول همواره بیش از ۵ میلی‌گرم بر لیتر بود.

برای انجام آزمایش‌های هیستوپاتولوژیک در پایان دوره از هر تکرار ۱ عدد ماهی به طور تصادفی انتخاب شد. نمونه برداری از کمان دوم آبشش سمت چپ صورت گرفت و سپس نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ تثبیت گردید. سپس به منظور رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ئوزین، قطعات کوچک ۱*۱ بافت‌ها جهت آنگیری در الکل قرار گرفتند. پس از آنگیری، نمونه‌ها جهت شفاف‌سازی و الکل‌گیری، در محلول گزلیل قرار داده شدند. در طی شفاف‌سازی در محلول گزلیل، ترکیبات لیپیدی معمولاً از بین می‌روند، لذا برای حفظ حالت طبیعی بافت‌ها و همچنین استحکام و پایداری در تهیه اسلاید به‌ویژه در مرحله برش، نمونه‌ها در پارافین مذاب در دمای ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از اتمام این مرحله، قالب‌گیری در پارافین صورت گرفت. تهیه اسلاید و برش به وسیله میکروتوم با ضخامت ۵ میکرون صورت گرفت و در نهایت لام‌های تهیه شده به

روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی گردید و با استفاده از چسب کانادا بالزام سطح نمونه‌ها پوشیده شد. پس از ثبت مشاهدات و بررسی علائم خارجی و ظاهری از قبیل تغییر رنگ بافت، تغییر در استحکام و شکل هندسی بافت، رنگ‌پریدگی، پرخونی یا کم‌خونی با چشم غیرمسلح، لام‌های آماده شده به وسیله میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰ و ۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به وجود لنز ۱۰ در عدسی چشمی در مجموع بزرگنمایی به صورت X ۱۰۰ و X ۴۰۰ مشاهده شد. در نهایت داده‌ها به صورت توصیفی ارائه شدند (Poosti and Sedigh Marvasti, 1999 ; Garooei et al., 2008).

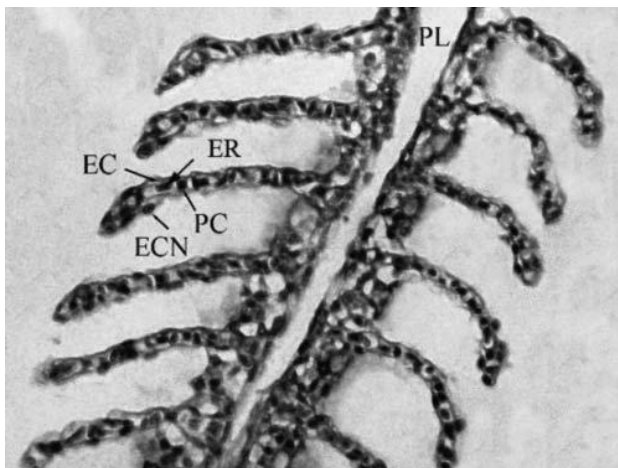
نتایج

علائم درمانگاهی مسمومیت با حشره‌کش‌های ارگانوفسفره، تیرگی و عدم تعادل است و در کالبد شکافی علاوه بر تجمع موکوس بر سطح بدن و آبشش، ممکن است خونریزی‌های نقطه‌ای در آبشش دیده شود. برخلاف نمونه بافت آبشش ماهیان شاهد (شکل ۱)، در مشاهده چشمی علائم ظاهری، تجمع مخاط بر روی بافت آبشش و نیز پرخونی آبشش‌ها مشاهده شد که گواهی بر اثرگذاری دیازینون بر بافت مورد نظر بود. شایع‌ترین پدیده مشاهده شده، چسبندگی لاملای ثانویه، شکستگی لاملاها و پرخونی بافت آبششی بود (شکل ۲- A و B).

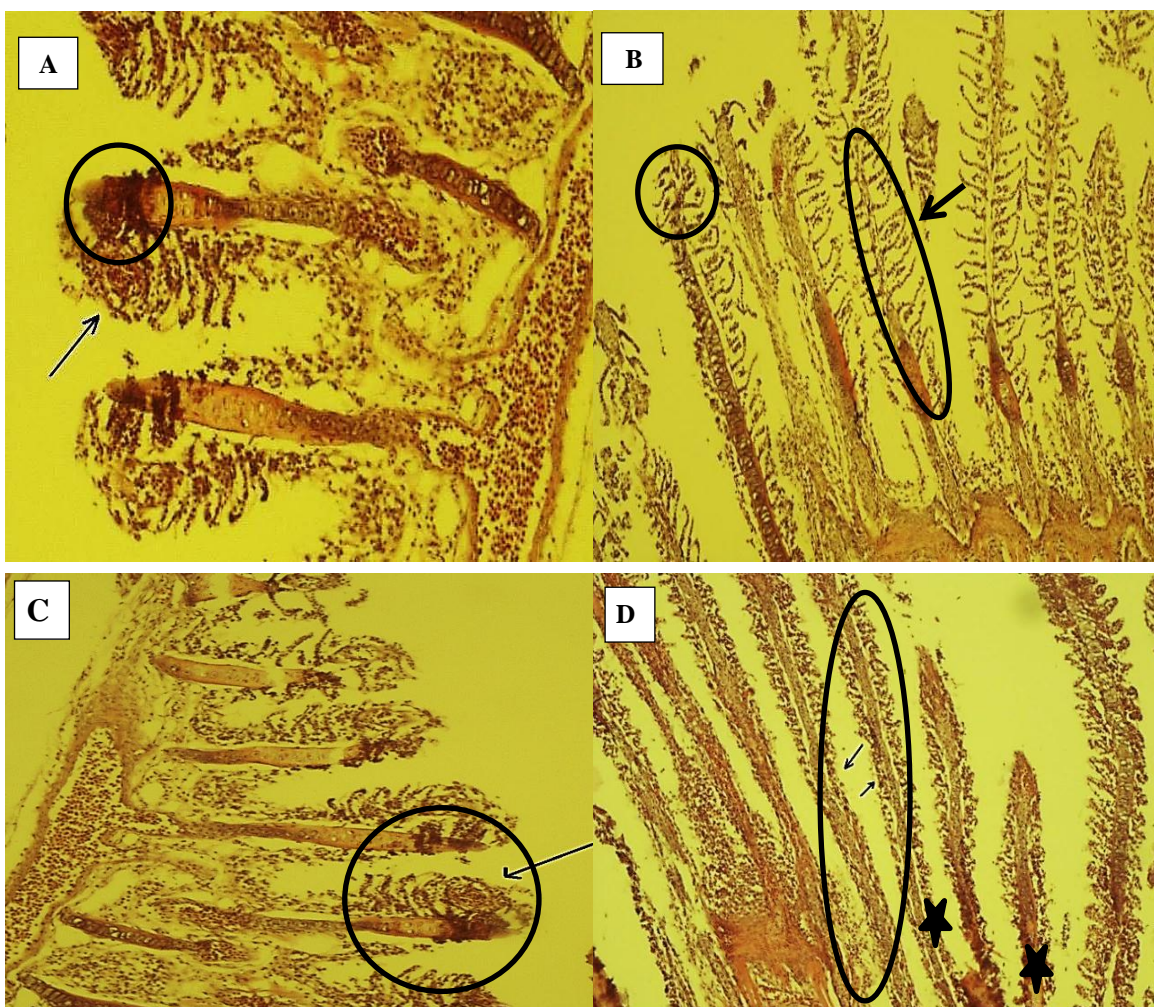
در تیمار ۱ (۰/۴۲ ppm) بیشترین اثری که دیازینون بر روی بافت آبشش داشت حالت پرخونی بود و علاوه بر پرخونی عوارضی همچون شکستگی لاملاها، به هم چسبندگی لاملاها و کوتاه شدن لاملاهای ثانویه هم دیده شد (شکل ۲- D). در تیمار ۲ (۰/۸۵ ppm) بیشترین عارضه‌هایی که مشاهده شد شکستگی لاملا و پرخونی بود البته عوارضی همچون به هم چسبندگی لاملاها، ریختگی لاملاهای دو سمت رشته آبشش، گریزی شدن و کوتاه شدن لاملای ثانویه نیز مشاهده شد (شکل ۲- C). در تیمار ۳ (۱/۲۸ ppm) بیشترین میزان آسیب بر روی آبشش، پرخونی بود و آسیب‌هایی مثل شکستگی لاملا، به هم چسبندگی و گریزی شدن مشاهده شد (شکل ۲- E و F) که مقدار این آسیب‌ها همانطور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود بیشتر از تیمار ۱ و ۲ بود اما در تیمار ۴ (۱/۷۱ ppm) بیشترین آسیب بافتی، ریختگی لاملاهای دو سمت رشته آبشش و پرخونی بود و همچنین عوارضی مانند شکستگی لاملاها، به هم چسبندگی لاملاها و گریزی شدن در بافت آبشش مشاهده گردید.

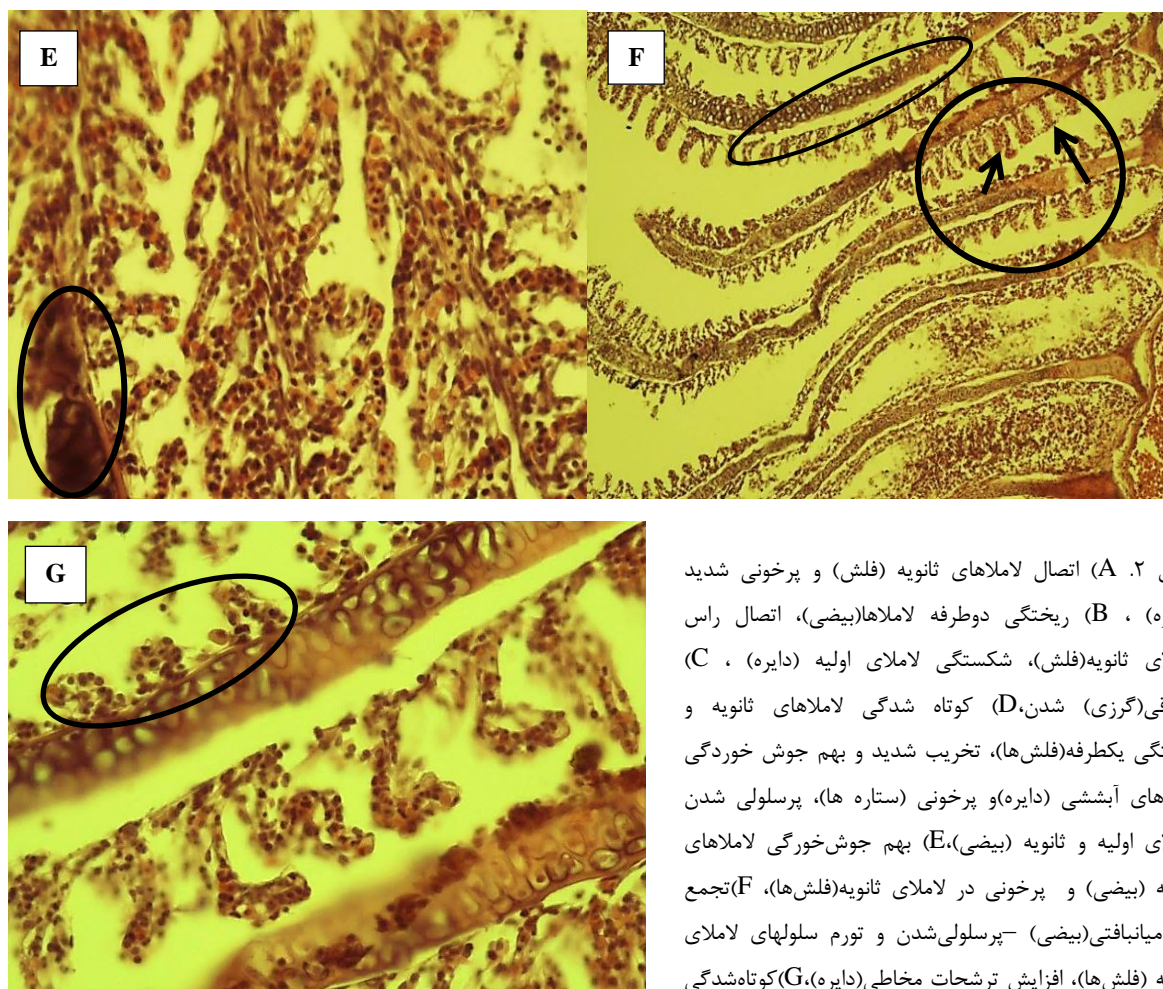
جدول ۲. عوارض مشاهده شده در آبشش ماهی کلمه قرار گرفته در معرض دوزهای متفاوت سم دیازینون

غلظت تحت کشنده دیازینون (ppm)					آسیب
۱/۷۱	۱/۲۸	۰/۸۵	۰/۲۴	۰	شکستگی لاملاها
++	++	++	+	-	اتصال لاملاهای ثانویه
++	++	+	+	-	پرخونی
+++	+++	++	++	-	گریزی شدن
++	+	-	-	-	ریختگی یکطرفه لاملاهای آبششی
-	-	-	+	-	ریختگی دوطرفه لاملاهای آبشش
+++	-	+	-	-	کوتاه شدن لاملاهای ثانویه
-	++	+	+	-	عدم مشاهده عارضه (-)، خفیف (+)، متوسط (++)، شدید (+++)



شکل ۱. تصویر بافت آبشش ماهی کلمه (گروه شاهد - X ۴۰۰).





شکل ۲. A) اتصال لاملاهای ثانویه (فلش) و پرخونی شدید (دایره)، B) ریختگی دوطرفه لاملاها (بیضی)، اتصال راس لاملاهای ثانویه (فلش)، شکستگی لاملاهای اولیه (دایره)، C) چماقی (گرزی) شدن، D) کوتاه شدگی لاملاهای ثانویه و ریختگی یکطرفه (فلشها)، تخریب شدید و بهم جوش خوردگی تیغه‌های آبششی (دایره) و پرخونی (ستاره‌ها)، پرسلولی شدن لاملاهای اولیه و ثانویه (بیضی)، E) بهم جوش خوردگی لاملاهای ثانویه (بیضی) و پرخونی در لاملاهای ثانویه (فلشها)، F) تجمع آب میانبافتی (بیضی) - پرسلولی شدن و تورم سلولهای لاملاهای ثانویه (فلشها)، افزایش ترشحات مخاطی (دایره)، G) کوتاه شدگی لاملاهای ثانویه (بزرگنمایی ۱۰۰ و ۴۰۰).

بحث

حشره‌کش‌های ارگانوفسفره، غالباً از طریق پوست سالم، بافت‌های تنفسی و لوله گوارشی ماهی جذب می‌شوند (Hedayati *et al.*, 2015). در ماهیان تحت تیمار به هم چسبیدگی تیغه‌های آبششی ناشی از پرسلولی شدن اپیتلیوم (شکل ۲-D) و نیز در نتیجه پرسلولی شدن و تورم سلول‌های پوششی از غشای پایه تا رأس تیغه آبششی حالت چماقی شدن به ویژه در رأس تیغه‌های آبششی پدیدار گردید (شکل ۲-C). Garoei و همکاران (2008)، گزارش کردند که ماهیان کلمه تحت تیمار سمیت حاد سولفات آلومینیوم پس از طی ۹۶ ساعت در pH=5 (اسیدی) مواردی از قبیل فیوژن (بهم جوش خوردگی) لاملاها و گرزی شدن را نشان دادند. افزایش ترشحات مخاطی (شکل ۲-F) نیز در تیغه‌های آبششی مشاهده گردید که به عنوان محافظی در محدود کردن دسترسی به سطح آبششی صورت می‌گیرد ولی افزایش آن ممکن است با مسدود کردن تبادل گازهای تنفسی منجر به خفگی شود (Poosti and Sedigh Marvasti, 1999).

ماهی قزل آلاهی رنگین کمان در معرض سم دیازینون، هایپرپلازی (پرسلولی شدن) لاملاهای ثانویه، بهم چسبیدگی لاملاها (فیوژن) و افزایش ترشحات موکوسی در ساختار آبشش نشان دادند. تورم سلولهای موکوسی، افزایش بیش از حد موکوس، هایپرپلازی سلول‌های کلراید در آبشش این ماهی می‌تواند در تنفس و تبادلات گازی و همچنین تبادلات یونی و تنظیم اسمزی آنها اختلال ایجاد نماید (Banaee *et al.*, 2011). پرخونی (افزایش اریتروسیت‌ها در رگ) (شکل ۲-A، D، E) و خون‌ریزی (ناشی از پاره شدن مویرگهای لاملا) از علائم مشهود بافت شناختی بود. اثر سمیت حاد دیازینون بر روی بچه

ماهیان شیپ (*Acipenser nudiventris*) مورد بررسی قرار گرفت (Khoshbavar Rostami *et al.*, 2005). این محققین گزارش نمودند که مسمومیت حاد سم دیازینون موجب کاهش گلبول سفید و میزان لنفوسیت شده و شکل تکامل یافته نوتروفیل افزایش معنی‌داری داشت. تغییرات حاصل در مقادیر سطوح اریتروسیت و لکوسیت ممکن است ناشی از اختلال در روند خونسازی و کاهش ایمنی غیراختصاصی ماهی باشد. با افزایش غلظت دیازینون شدت آسیب‌های بافتی در آبشش ماهیان افزایش یافت.

شدت علائم ظاهری بسته به دوز بوده و بیشترین علائم در تیمار ۱/۷۱ ppm دیده شد که شامل بیقراری، شنای غیرعادی، شنای نزدیک به سطح آب همراه با تولید بیش از حد مخاط بود و نشان از اختلال در عملکرد صحیح دستگاه تنفس ماهیان تحت تیمار داشت. اولین اثر سمی حشره‌کش‌های ارگانوفسفره مهار کردن کولین‌استرازها که مهمترین آنها استیل کولین‌استراز است، می‌باشد. وجود استیل کولین‌استراز برای از بین بردن استیل کولین اضافی در پیوندگاه عصب عضله پس از انقباض عضله ضروری است. بنابراین کنترل عضلانی دچار اختلال شده و ممکن است به ظهور گوزپشتی افقی و عمودی اولیه منجر شود که یکی از آثار نیمه کشندگی این حشره‌کش‌هاست (Luskova *et al.*, 2002).

تورم سلول‌های تیغه‌های آبششی و از هم‌گسیختگی سلول‌های پوششی باعث افزایش فاصله انتشار از آب به خون، کاهش فشار اکسیژن و افزایش تهویه تنفسی می‌گردد. از آنجا که دیازینون از طریق آبشش، پوست و سیستم گوارشی به راحتی وارد بدن ماهی‌ها می‌شود، قابلیت انحلال این سم در چربی سبب شده تا این سم به راحتی از ساختار فسفولیپیدی غشاهای زیستی عبور نماید و در طی کمتر از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض سم، غلظت سم در بافت‌های مختلف بدن به ویژه خون، به سطح مشابه آن در محیط برسد و به تدریج در بافت‌های مختلف بدن تجمع یابد (Vale, 1998). عدم تغییر در بافت آبشش تیمار شاهد، تأییدی بر اثر مخرب سم دیازینون بر بافت‌های تحت تیمار می‌باشد. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان نمود که دیازینون در سطح استرس تحت کشنده دارای اثرات متعدد بافتی بر آبشش ماهی کلمه بوده و در کوتاه مدت به شدت سمی می‌باشد و بسیاری از عوارض بافتی غیرقابل بازگشت ایجاد می‌نماید. همچنین می‌توان از این شاخص‌ها به عنوان بیومارکرهای ردیابی اثرات دیازینون بر سلامت ماهی کلمه و نهایتاً اکوسیستم دریای خزر استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق از طرح پژوهشی در قالب اعتبار پژوهشی اعضای هیات علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفته است. بدینوسیله از اساتید محترم و همکاران گرامی دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه به دلیل در اختیار قرار گذاشتن امکانات لازم قدردانی و تشکر می‌گردد.

منابع

- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Ahmadi, K. 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99: 1-6.
- Garoei, H., Jamili, Sh., Rostami, M. 2008. Lethal effect of aluminum sulphate on gill tissue of roach *Rutilus rutilus*. *Research Journal of Poultry and Aquatic Animals*. 79: 193-196. (in Persian).
- Hedayati, A., Ghaffari, H., Shahbazi, S., Gerami, M.H. 2015. Acute toxicity and behavioral changes associated with diazinon in *Rutilus rutilus caspicus* and *Hypophthalmichthys molitrix*. *Iranian Journal of Toxicology*. 9(30): 1354-1359.

- Khoshbavar Rostami, H., Soltani, M., Yelghi, S. 2005. Effect of Diazinon on some blood indices of *Acipenser stellatus* and its LC50. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. 5: 41-49. (in Persian)
- Luskova, V., Svoboda, M., Kolarva, J. 2002. The effect of Diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio*). Acta Veterinaria Brnova. 71: 117- 123.
- Oh, H.S., Lee, S.K., Kim, Y.H., Roh, J.K. 1991. Mechanism of selective toxicity of diazinon of killkafish (*Oryzias latipes*) and loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Aquatic Toxicology and Risk Assessment. 14: 343-353.
- Poosti, A., Sedigh Marvasti, A. 1999. Fish Histology. Publication of Tehran University. 328 P. (in Persian)
- Pourahmad, J. 2006. General Toxicology. Iran, Samt Publishing. 104-120. (in Persian).
- Shamloofar, M., Hajimoradloo, A. 2008. Detect of LC50 and some tissue lesions of Sovin poison on common carp fry *Cyprinus carpio*. Fishery Journal of Azadshahr University. 2(3): 27-34. (in Persian)
- Vale, J.A. 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus OP insecticide poisoning. Toxicology Letter. 102: 641-649.